

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
15. Januar 2004 (15.01.2004)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 2004/004455 A2**

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: **A01N 1/00**

(21) Internationales Aktenzeichen: **PCT/DE2003/002245**

(22) Internationales Anmeldedatum:  
4. Juli 2003 (04.07.2003)

(25) Einreichungssprache: **Deutsch**

(26) Veröffentlichungssprache: **Deutsch**

(30) Angaben zur Priorität:  
102 30 210.3 4. Juli 2002 (04.07.2002) **DE**

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von  
US): **MICRONAS HOLDING GMBH [DE/DE]; Hans-  
Bunte-Strasse 19, 79108 Freiburg (DE).**

(71) Anmelder und

(72) Erfinder: **KLAPPROTH, Holger [DE/DE]; Kehler-  
strasse 12, 79108 Freiburg (DE).**

(74) Anwalt: **STÜRKEN, Joachim; Joachim Stürken Paten-  
tanwalts-gesellschaft mbH, Engesserstr. 4A, 79108  
Freiburg (DE).**

(81) Bestimmungsstaaten (national): **AE, AG, AL, AM, AT,  
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,**

**CU, CZ, DE (Gebrauchsmuster), DK, DM, DZ, EC, EE,  
ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP,  
KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA,  
MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG,  
PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM,  
TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM,  
ZW.**

(84) Bestimmungsstaaten (regional): **ARIPO-Patent (GH,  
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),  
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,  
TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE,  
DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL,  
PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG,  
CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).**

Erklärung gemäß Regel 4.17:

— *Erfindererklärung (Regel 4.17 Ziffer iv) nur für US*

Veröffentlicht:

— *ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu ver-  
öffentlichen nach Erhalt des Berichts*

*Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Ab-  
kürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Co-  
des and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der  
PCT-Gazette verwiesen.*

(54) Title: **COMPOSITION AND METHOD FOR STABILISING BIOMOLECULES**

(54) Bezeichnung: **ZUSAMMENSETZUNG UND VERFAHREN ZUR STABILISIERUNG VON BIOMOLEKÜLEN**

(57) Abstract: The invention relates to general biotechnology and, in particular to compositions and methods for stabilising or preserving biological molecules and to devices which produce the thus stabilised molecules.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft allgemein das Gebiet der Biotechnologie. Insbesondere betrifft die Erfindung Zusammensetzungen und Verfahren zur Stabilisierung bzw. Konservierung von biologischen Molekülen sowie Vorrichtungen, welche entsprechend stabilisierte Biomoleküle aufweisen.

WO 2004/004455 A2

Zusammensetzung und Verfahren zur Stabilisierung  
von Biomolekülen

Die vorliegende Erfindung betrifft allgemein das Gebiet der Biotechnologie. Insbesondere betrifft die Erfindung Zusammensetzungen und Verfahren zur Stabilisierung bzw. Konservierung von biologischen Molekülen sowie Vorrichtungen, welche entsprechend stabilisierte Biomoleküle aufweisen.

Die Verwendung von Proteinen und Polypeptiden in industriellen Produkten und Verfahren erfordert große Mengen dieser Biomoleküle, insbesondere für klinisch-diagnostische und pharmazeutische Zwecke. Während die hierfür erforderlichen Basistechniken wie Isolierung und Aufreinigung von Proteinen im industriellen Maßstab zumeist etabliert sind, liegt der schwierigste Aspekt der Verwendung derartiger Biomoleküle in der Aufrechterhaltung der für die beabsichtigte Verwendung gewünschten nativen bzw. aktiven Moleküleigenschaften. Insbesondere bei der Lagerung und dem Transport von Biomolekülen müssen häufig Verluste der Aktivität hingenommen werden, wodurch der Erfolg späterer Anwendungen gefährdet sein kann. Kommerziell erhältliche Proteinpräparationen enthalten daher zumeist Verbindungen, durch deren Anwesenheit der Aktivitätsverlust während der Lagerung oder des Transports vermindert werden kann. Weiterhin erfolgen die Lagerung sowie der Transport zumeist unter niedrigen Temperaturen, obgleich ein Einfrieren von z.B. bestimmten Proteinen aufgrund molekularer Veränderungen unerwünscht sein kann.

Aus der Literatur ist bekannt, dass bestimmte Pflanzen und Tiere Mechanismen entwickelt haben, um den Zustand einer annähernd vollständigen Dehydratation zu überleben. Dieser

Stresszustand wird als Anhydrobiose bezeichnet und wird bei Organismen beobachtet, die Trockenbedingungen ausgesetzt werden. Während der Anhydrobiose befindet sich der Organismus in einer Art Ruhezustand, bis eine Rehydratation es erlaubt, den normalen Stoffwechsel fortzusetzen. Gemeinsame, charakteristische Eigenschaft dieser Organismen ist die Synthese von hohen Konzentrationen an nicht-reduzierenden Zuckern, die durch anhydrobiotische Bedingungen induziert wird. Die als Antwort auf Dehydratisierung bei verschiedenen Organismen beobachtete Akkumulation großer Mengen an Trehalose führt zu einem Schutz von Membranen und Proteinen vor Schädigungen der molekularen Integrität und korreliert mit einer gewissen Toleranz gegenüber Wasserentzug. Man nimmt an, dass der Zucker die entzogenen Wassermoleküle ersetzt bzw. funktional substituiert und an der Bildung eines intrazellulären organischen Glases beteiligt ist, von dem man vermutet, dass es die Zellinhalte stabilisiert.

Im Stand der Technik wird die Verwendung von Trehalose bei der Herstellung von mit Antikörpern beschichteten Mikrotiterplatten beschrieben, um diese normalerweise sehr schnell denaturierenden Proteinspecies zu stabilisieren (V. K. Nguyen et al., Protection of immunoreactivity of dry immobilized proteins on microtitration plates in ELISA: application for detection of autoantibodies in Myasthenia gravis, *J. of Biotechnology*, 72, S. 115 bis 125 (1999)). Hierzu wurden Mikrotiterplatten mit darauf immobilisierten Antikörpern mit einem Rinderserumalbumin (BSA) und Trehalose enthaltenden Film beaufschlagt und anschließend getrocknet. Die auf den in dieser Weise erzeugten ELISA-Platten immobilisierten, getrockneten Antikörper zeigten auch bei erhöhten Temperaturen (bis zu 50 °C) eine Lagerungsfähigkeit von bis zu 30 Tagen.

Eine insbesondere aus wirtschaftlicher Sicht anzustrebende Verlängerung der Lagerungsfähigkeit unter Raumtemperatur- oder sogar Tropenbedingungen kann mit dieser Technologie jedoch nicht erreicht werden. Insbesondere im Zusammenhang mit der Bereitstellung großer Mengen an immobilisierten Proteinen ist eine Lagerungsfähigkeit für eine Zeitdauer von über einem Jahr bei im wesentlichen gleichbleibender biologischer Aktivität bzw. Funktionalität der Biomoleküle wünschenswert.

Ein weiterer Nachteil der zuvor beschriebenen Technologie liegt in der Verwendung von Rinderserumalbumin (BSA), einem Proteingemisch, von dem bekannt ist, dass es im Rahmen Antikörper-gestützter Anwendungen unspezifische Bindungen mit den Antikörpern eingeht und damit unerwünschte Kreuzreaktionen verursacht, durch die das gesamte Untersuchungsergebnis negativ beeinträchtigt wird.

Insbesondere von pflanzlichen Samen und Pollen ist bekannt, dass in ihnen als Reaktion auf Wasserentzug Proteine der LEA-Klasse gebildet werden (LEA = 'late embryogenesis abundant') (J. Ingram und D. Bartels, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 47, S. 377 bis 403 (1996)). Die mittlerweile auch in Nematoden identifizierten LEA-Proteine enthalten ein spezielles, 11 Aminosäuren umfassendes Motiv, welches vermutlich eine amphipatische  $\alpha$ -Helix ausbildet, durch das die Oligomerisierung des Proteins gesteuert wird. Die LEA-Proteine sind extrem hydrophil und gegenüber einer Denaturierung durch Hitze resistent. Erste Versuche mit einem aus Pollen von *Typha latifolia* gereinigten Protein dieser Klasse haben gezeigt, dass sich Sucrosegeläser in vitro durch Inkubation mit diesem Protein stabilisieren lassen. Es wird daher vermutet, dass nicht-reduzierende Zucker und Vertreter der LEA-Proteinklasse in synergistischer Weise zusammenwirken bei der Bildung eines

stabilen Bioglasses im Cytoplasma von anhydrobiotischen Pflanzen und in gegenüber Austrocknung resistenten Samen und Pollen (J. Brown et al., Plant desiccation gene found in a nematode, *Nature*, 416, S. 38 (2002)).

Aufgabe der Erfindung ist daher die Bereitstellung von Zusammensetzungen und Verfahren zur Stabilisierung bzw. Konservierung von Biomolekülen, mit denen die Nachteile des Standes der Technik überwunden werden und mit denen die gewünschte biologische Aktivität der Moleküle über einen längeren Zeitraum auch ohne Kühlung gewährleistet wird.

Die Aufgabe wird erfindungsgemäß durch die Zusammensetzung gemäß Hauptanspruch gelöst.

Die erfindungsgemäße Zusammensetzung umfasst mindestens ein nicht-reduzierendes Disaccharid, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Trehalose (D-Glucopyranosyl-D-glucopyranose), Sucrose ( $\beta$ -D-Fructofuranosyl- $\alpha$ -D-glycopyranosid), sowie Derivaten davon, und mindestens ein Protein oder Polypeptid der LEA-Klasse.

Nach einer bevorzugten Ausführungsform umfasst die erfindungsgemäße Zusammensetzung Trehalose sowie mindestens ein Protein oder Polypeptid der LEA-Klasse mit einem 11 Aminosäuren umfassenden Motiv, welches durch die folgende allgemeine Formel (SEQ ID NO. 1) charakterisiert ist:

(1)-(2)-(3)-(4)-(5)-(6)-(7)-(8)-(9)-(10)-E,

wobei (1) K oder T,

(2) A, G, K, M oder T,

(3) R, D, A, E, Q oder K,

(4) E, K oder S,

(5) T, F, Y oder A,

- (6) K, R, T oder A,
- (7) D, E oder Q,
- (8) S, R, Y oder K,
- (9) A oder T, und
- (10) G, A oder R,

bedeuten.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform umfasst die Zusammensetzung mindestens ein Protein oder Polypeptid der LEA-Unterklasse 3 mit einer Aminosäuresequenz, die von einer Nukleotidsequenz kodiert wird, wie sie in der GenBank unter der Zugriffsnummer AF423069 oder S39475 hinterlegt ist.

Die erfindungsgemäße Zusammensetzung umfasst am meisten bevorzugt mindestens ein Protein oder Polypeptid der LEA-Unterklasse 3 mit einem 11 Aminosäuren umfassenden Motiv, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus:

- (a) K-T-A-E-F-R-D-S-A-G-E (SEQ ID NO. 2),
- (b) K-G-Q-E-F-K-E-R-A-G-E (SEQ ID NO. 3),
- (c) K-A-E-E-T-K-Q-R-A-G-E (SEQ ID NO. 4),
- (d) K-M-D-E-T-K-Q-R-A-G-E (SEQ ID NO. 5),
- (e) K-A-R-K-T-K-D-S-A-A-E (SEQ ID NO. 6),
- (f) K-A-K-E-Y-K-D-Y-T-A-E (SEQ ID NO. 7),
- (g) K-A-R-E-T-T-E-K-A-R-E (SEQ ID NO. 8), und
- (h) T-K-D-S-A-A-E-K-A-R-E (SEQ ID NO. 9).

Nach einer bevorzugten Ausführungsform umfasst die Zusammensetzung die Komponenten des nicht-reduzierenden Disaccharids und des Proteins oder Polypeptids der LEA-Klasse in jeweiligen Mengen von 0,01 bis 15 beziehungsweise 0,00001 bis 1 Gewichtsprozent, jeweils bezogen auf eine gebrauchsfertige Lösung.

Beispielsweise wird die Zusammensetzung hergestellt, indem einer Lösung aus 50 mM Phosphat und 100 mM NaCl mit einem pH-Wert von 6,8 0,1 Gew.% gereinigtes LEA-Protein und 5 Gew.% Trehalose zugegeben werden. Gewünschtenfalls können auch weitere Komponenten wie z.B. Natriumazid (0,02 Gew.%) zugesetzt werden.

Für den Fachmann ist klar, dass er anhand der erfindungsgemäß bereitgestellten Sequenz- und Motivinformationen homologe Vertreter der Proteinklasse LEA aus anderen Quellen auffinden und erfindungsgemäß einsetzen kann. Folglich sind alle Homologa umfasst, sofern sie in der Lage sind, ein aus nicht-reduzierenden Zuckern wie insbesondere Trehalose und/oder Sucrose gebildetes biologisches Glas zu stabilisieren.

Beispielhafte Vertreter der Proteinklasse LEA sind in der nachfolgenden Tabelle aufgeführt, stellen aber keine Beschränkung der vorliegenden Erfindung dar. Die jeweiligen Sequenzinformationen können vom Fachmann anhand der bereitgestellten Daten leicht erhalten werden.

Datenbank	Organismus	Bezeichnung (Zugriffsnummer)
SWISS-PROT	Gossypium hirsutum	P09422
SWISS-PROT	Raphanus sativus	P21208
SWISS-PROT	Zea mays	P46517
SWISS-PROT	Hordeum vulgare	Q02400
SWISS-PROT	Hordeum vulgare	Q05191
SWISS-PROT	Hordeum vulgare	Q5190
SWISS-PROT	Hordeum vulgare	P46532
SWISS-PROT	Helianthus annuus	P46515
SWISS-PROT	Helianthus annuus	P46515

SWISS-PROT	Gossypium hirsutum	P09411
SWISS-PROT	Gossypium hirsutum	P46518
SWISS-PROT	Gossypium hirsutum	P09443
SWISS-PROT	Gossypium hirsutum	P13940
SWISS-PROT	Gossypium hirsutum	P09444
SWISS-PROT	Gossypium hirsutum	P46521
SWISS-PROT	Gossypium hirsutum	P4522
SWISS-PROT	Brassica napus	P13934
SWISS-PROT	Gossypium hirsutum	P13939
SWISS-PROT	Zea mays	Q42376
SWISS-PROT	Tricicum aestivum	Q03968
TrEMBL	Phaseolus vulgaris	O24442
TrEMBL	Arabidopsis thaliana	O64820
TrEMBL	Arabidopsis thaliana	O65148
TrEMBL	Arabidopsis thaliana	O80576
TrEMBL	Arabidopsis thaliana	O81483
TrEMBL	Oryza sativa	P83196
TrEMBL	Oryza sativa	P83197
TrEMBL	Glycine max	P93165
TrEMBL	Glycine max	Q01527
TrEMBL	Tricicum aestivum	Q03967
TrEMBL	Arabidopsis thaliana	Q39138
TrEMBL	Citrus sinensis	Q39466
TrEMBL	Chlorella vulgaris	Q39660
TrEMBL	Gossypium hirsutum	Q39793
TrEMBL	Gossypium hirsutum	Q39797
TrEMBL	Glycine soja	Q39919
TrEMBL	Onoclea sensibilis	Q40697
TrEMBL	Picea glauca	Q40842
TrEMBL	Picea glauca	Q40843
TrEMBL	Picea glauca	Q40848
TrEMBL	Picea glauca	Q40858



TrEMBL	Picea glauca	Q40869
TrEMBL	Zea mays	Q41804
TrEMBL	Oryza sativa	Q8S4X7
TrEMBL	Brassica campestris	Q8S8Z2
TrEMBL	Brassica napus	Q8S8Z2
TrEMBL	Arabidopsis thaliana	Q96273
TrEMBL	Oryza sativa	Q9AWZ5
TrEMBL	Arabidopsis thaliana	Q9FG31
TrEMBL	Arabidopsis thaliana	Q9FK14
TrEMBL	Arabidopsis thaliana	Q9FK15
TrEMBL	Arabidopsis thaliana	Q9FKV7
TrEMBL	Oryza sativa	Q9FPB2
TrEMBL	Arabidopsis thaliana	Q9LF88
TrEMBL	Oryza sativa	Q9LGL8
TrEMBL	Arabidopsis thaliana	Q9LT74
TrEMBL	Euphorbia esula	Q9M556
TrEMBL	Arabidopsis thaliana	Q9S7S3
TrEMBL	Oncolea sensibilis	Q9S2B2
TrEMBL	Arabidopsis thaliana	Q9SKP0
TrEMBL	Chlorella vulgaris	Q9SLP7
TrEMBL	Arabidopsis thaliana	Q9XID7
TrEMBL	Arabidopsis thaliana	Q9ZPW6
TrEMBL	Glycine max	Q9ZT22

Die erfindungsgemäß vorgeschlagenen LEA-Proteine oder Polypeptide können aus natürlichen Quellen isoliert, rekombinant hergestellt oder synthetisiert werden. Die hierfür anzuwendenden Verfahren sind dem Fachmann gut bekannt.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft die Bereitstellung eines Verfahrens zur Stabilisierung bzw. Konservierung von Biomolekülen, bei dem die zu schützenden

Moleküle in der erfindungsgemäßen Zusammensetzung inkubiert werden. Nach ausreichender Inkubationsdauer kann der Ansatz nachfolgend z.B. bei Raumtemperatur trocknen und bis zur Verwendung ohne Kühlung gelagert werden. Sofern das Verfahren zur Stabilisierung von auf bestimmten Oberflächen immobilisierten Biomolekülen angewendet werden soll, werden diese beladenen Oberflächen mit der erfindungsgemäßen Zusammensetzung beaufschlagt. Dies kann beispielsweise durch Aufsprühen der Zusammensetzung auf die Oberfläche oder durch Eintauchen der Oberfläche in die Zusammensetzung erfolgen. Im Falle des Tauchverfahrens sollte die Oberfläche vorzugsweise mit einer Geschwindigkeit von etwa 2 mm pro Sekunde herausgezogen werden, damit eine gleichmäßige Benetzung mit der erfindungsgemäßen Zusammensetzung erfolgen kann.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft die Bereitstellung von Oberflächen, die mit der erfindungsgemäßen Zusammensetzung beaufschlagt sind. Auf bevorzugten Oberflächen sind Biomoleküle direkt oder indirekt immobilisiert und werden von der erfindungsgemäßen Zusammensetzung stabilisiert bzw. konserviert. Besonders bevorzugte Oberflächen sind Bestandteile von analytischen und/oder diagnostischen Vorrichtungen, wie z.B. Biochips, Sensorchips, Mikrotiterplatten, Reaktionsröhrchen und dergleichen. Das Material der Oberfläche unterliegt hierbei keiner Beschränkung und kann beispielsweise aus Glas, Quarzglas, Quarz, Silizium, Polymeren (PMMA, Polystyrol, Polyethylen, Polypropylen, PVC etc.), und Membranen wie z.B. Nitrozellulose-, Nylon- und Mikrofasermembranen sowie Papier ausgewählt werden.

Die vorliegend verwendeten Begriffe „biologische Moleküle“ und „Biomoleküle“ umfassen jedwede Substanzen und Verbindungen im wesentlichen biologischen Ursprungs, die über Eigenschaften

verfügen, welche im Rahmen wissenschaftlicher, diagnostischer und/oder pharmazeutischer Anwendungen relevant sind. Umfasst sind nicht nur native Moleküle, wie sie aus natürlichen Quellen isoliert werden können, sondern auch davon abgeleitete Formen, Fragmente und Derivate, sowie rekombinante Formen und artifizielle Moleküle, sofern sie mindestens eine Eigenschaft der nativen Moleküle aufweisen. Bevorzugte Biomoleküle sind solche, die für analytische, diagnostische und/oder pharmazeutische Zwecke eingesetzt werden können, wie Nukleinsäuren und deren Derivate (DNA, RNA, PNA, LNA, Ribozyme, Oligonukleotide, Plasmide, Chromosomen), Peptide und Proteine (Enzyme, Rezeptorproteine, Proteinkomplexe, Peptidhormone, Antikörper) sowie biologisch aktive Fragmente derselben, Kohlenhydrate und deren Derivate wie insbesondere glykosylierte Proteine und Glykoside, und Fette, Fettsäuren und Lipide.

Für den Fachmann ist klar, dass sich die erfindungsgemäßen Zusammensetzungen und Verfahren auch auf zelluläre Gewebe und vollständige Zellen sowie Teile derselben (Organellen, Membranen und Membranfragmente etc.) anwenden lassen, sofern sie Träger der obigen Biomoleküle sind. Deshalb sind Gewebe, Zellen und Teile derselben grundsätzlich vom Begriff „Biomoleküle“ umfasst.

Die verwendeten Begriffe „Stabilisierung“ und „Konservierung“ beziehen sich auf die strukturelle bzw. funktionelle Integrität von Biomolekülen und den hierauf basierenden biologischen Eigenschaften. Die für einen bestimmten Anwendungszweck erforderliche Aktivität eines Biomoleküls erfordert z.B. die weitgehende Beibehaltung seiner Primär-, Sekundär- und/oder Tertiärstruktur. Die biologische Aktivität einer Nukleinsäure-sonde umfasst beispielsweise ihre Eigenschaft zur Ausbildung eines Hybridisierungskomplexes mit einem Nukleinsäuretarget,

welches zur Sonde komplementär ist. Die biologische Aktivität eines Antikörpers umfasst beispielsweise die spezifische Bindung seines Antigens.

Die Erfindung wird anhand des nachfolgenden Beispiels näher erläutert.

#### Beschichtung von Oberflächen

Die Herstellung einer erfindungsgemäßen Zusammensetzung erfolgt durch Auflösen von 0,1 % (Gew./Vol.) rekombinantem LEA-Protein und 5 % (Gew./Vol.) Trehalose in 100 ml Phosphatpuffer (50 mM Phosphat, 100 mM NaCl, pH 6,8). Anschließend werden 0,02 % (Gew./Vol.) Natriumazid als cytotoxisches Agens gegen mikrobielle Verunreinigungen zugegeben. Nach Sterilfiltration der erhaltenen Lösung unter Verwendung eines 0,2 µm Filters erfolgt die Aufbewahrung in einer autoklavierten sterilen Flasche.

Zum Beschichten erfindungsgemäß geeigneter Oberflächen werden Biochips (z.B. Objektträger) mit immobilisierten Biomolekülen im Reinraum (bzw. Sterilwerkbank) in die Lösung eingetaucht und mit einer Geschwindigkeit von 2mm/sec wieder aus der Lösung herausgezogen. Dabei trocknet eine dünne Schicht der Trehalose/LEA - Lösung auf dem Chip an und führt zu einer Stabilisierung der Biomoleküle.

Zur Lagerung können die auf diese Weise behandelten Chips mit den stabilisierten Biomolekülen in Kunststofftaschen verpackt und unter Stickstoffatmosphäre bei Raumtemperatur gelagert werden. Die Taschen können vorteilhafterweise in einer lichtdichten Kartonage verpackt werden, um einer möglichen Photodegradation der Proteine vorzubeugen.

Zur Verwendung die Chips werden der Verpackung entnommen und mit Assay-Buffer (z.B. PBS-Puffer) rehydriert (5 min, RT). Anschließend wird die Probenflüssigkeit direkt auf den Chips inkubiert und der Assay durchgeführt. Es können alle Arten der im Stand der Technik bekannten Rezeptor-Liganden Interaktionen durchgeführt werden. Wahlweise kann auch auf das Entfernen des Stabilisators verzichtet werden. In diesem Fall wird die Probe direkt auf die Trehalose-beschichteten Oberflächen gegeben. Dies ist vor allem dann praktikabel, wenn zuvor gezeigt wurde, dass weder Trehalose noch das LEA- Protein mit dem Nachweis interferieren.

Patentansprüche

1. Zusammensetzung zur Stabilisierung bzw. Konservierung von Biomolekülen, umfassend mindestens ein nicht-reduzierendes Disaccharid und mindestens ein Protein oder Polypeptid der LEA-Klasse.
2. Zusammensetzung nach Anspruch 1, wobei das nicht-reduzierende Disaccharid ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Trehalose (D-Glucopyranosyl-D-glucopyranose), Sucrose ( $\beta$ -D-Fructofuranosyl- $\alpha$ -D-glucopyranosid), sowie Derivaten davon.
3. Zusammensetzung nach Anspruch 1 oder 2, wobei das nicht-reduzierende Disaccharid Trehalose ist.
4. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei das mindestens eine Protein oder Polypeptid der LEA-Klasse ein 11 Aminosäuren umfassendes Motiv aufweist, welches durch die folgende allgemeine Formel (SEQ ID NO. 1) charakterisiert ist:  
(1)-(2)-(3)-(4)-(5)-(6)-(7)-(8)-(9)-(10)-E,  
wobei (1) K oder T,  
(2) A, G, K, M oder T,  
(3) R, D, A, E, Q oder K,  
(4) E, K oder S,  
(5) T, F, Y oder A,  
(6) K, R, T oder A,  
(7) D, E oder Q,  
(8) S, R, Y oder K,  
(9) A oder T, und  
(10) G, A oder R,  
bedeuten.

5. Zusammensetzung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, umfassend mindestens ein Protein oder Polypeptid der LEA-Unterklasse 3 mit einer Aminosäuresequenz, die von einer Nukleotidsequenz kodiert wird, wie sie in der GenBank unter der Zugriffsnummer AF423069 oder S39475 hinterlegt ist.
6. Zusammensetzung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, bei der das mindestens eine Protein oder Polypeptid der LEA-Unterklasse 3 ein 11 Aminosäuren umfassendes Motiv aufweist, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus:
- (a) K-T-A-E-F-R-D-S-A-G-E (SEQ ID NO. 2),
  - (b) K-G-Q-E-F-K-E-R-A-G-E (SEQ ID NO. 3),
  - (c) K-A-E-E-T-K-Q-R-A-G-E (SEQ ID NO. 4),
  - (d) K-M-D-E-T-K-Q-R-A-G-E (SEQ ID NO. 5),
  - (e) K-A-R-K-T-K-D-S-A-A-E (SEQ ID NO. 6),
  - (f) K-A-K-E-Y-K-D-Y-T-A-E (SEQ ID NO. 7),
  - (g) K-A-R-E-T-T-E-K-A-R-E (SEQ ID NO. 8), und
  - (h) T-K-D-S-A-A-E-K-A-R-E (SEQ ID NO. 9).
7. Zusammensetzung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, umfassend die Komponenten des nicht-reduzierenden Disaccharids und des Proteins oder Polypeptids der LEA-Klasse in jeweiligen Mengen von 0,01 bis 15 beziehungsweise 0,00001 bis 1 Gewichtsprozent, jeweils bezogen auf eine gebrauchsfertige Lösung.
8. Verfahrens zur Stabilisierung bzw. Konservierung von Biomolekülen, bei dem die zu schützenden Moleküle in der Zusammensetzung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 7 inkubiert werden.
9. Verfahren zur Stabilisierung bzw. Konservierung von auf Oberflächen immobilisierten Biomolekülen, bei dem diese

beladenen Oberflächen mit der Zusammensetzung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 7 beaufschlagt werden.

10. Oberfläche mit immobilisierten und stabilisierten bzw. konservierten Biomolekülen, erhalten durch das Verfahren gemäß Anspruch 9.
11. Oberfläche, beaufschlagt mit der Zusammensetzung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 7.
12. Oberfläche nach Anspruch 10 oder 11 als Bestandteil einer analytischen und/oder diagnostischen Vorrichtung.
13. Analytische und/oder diagnostische Vorrichtung, umfassend eine Oberfläche nach einem der Ansprüche 10 bis 12.
14. Vorrichtung nach Anspruch 13, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Biochips, Sensorchips, Mikrotiterplatten, Reaktionsröhrchen und Kulturschalen.



## SEQUENZPROTOKOLL

<110> Micronas Holding GmbH  
Klapproth, Holger

<120> Zusammensetzung und Verfahren zur Stabilisierung von  
Biomolekülen

<130> 1034

<140>  
<141>

<160> 9

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Motiv der  
LEA Klasse

<220>  
<223> Aminosäureposition 1: X= K oder T

<220>  
<223> Aminosäureposition 2: X=A oder G oder K oder M  
oder T

<220>  
<223> Aminosäureposition 3: X=R oder D oder A oder E  
oder Q oder K

<220>  
<223> Aminosäureposition 4: X= E oder K oder S

<220>  
<223> Aminosäureposition 5: X= T oder F oder Y oder A

<220>  
<223> Aminosäureposition 6: X= K oder R oder T oder A

<220>  
<223> Aminosäureposition 7: X= D oder E oder Q

<220>  
<223> Aminosäureposition 8: X= S oder R oder Y oder K

<220>  
<223> Aminosäureposition 9: X= A oder T

<220>  
<223> Aminosäureposition 10: X= G oder A oder R

<400> 1  
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Glu  
1 5 10

<210> 2

<211> 11  
<212> PRT  
<213> Aphelenchus avenae

<400> 2  
Lys Thr Ala Glu Phe Arg Asp Ser Ala Gly Glu  
1 5 10

<210> 3  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Aphelenchus avenae

<400> 3  
Lys Gly Gln Glu Phe Lys Glu Arg Ala Gly Glu  
1 5 10

<210> 4  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Aphelenchus avenae

<400> 4  
Lys Ala Glu Glu Thr Lys Gln Arg Ala Gly Glu  
1 5 10

<210> 5  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Aphelenchus avenae

<400> 5  
Lys Met Asp Glu Thr Lys Gln Arg Ala Gly Glu  
1 5 10

<210> 6  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Betula pendula

<400> 6  
Lys Ala Arg Lys Thr Lys Asp Ser Ala Ala Glu  
1 5 10

<210> 7  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Betula pendula

<400> 7  
Lys Ala Lys Glu Tyr Lys Asp Tyr Thr Ala Glu  
1 5 10

<210> 8  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Betula pendula

WO 2004/004455

PCT/DE2003/002245

<400> 8 3  
Lys Ala Arg Glu Thr Thr Glu Lys Ala Arg Glu  
1 5 10

<210> 9  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Betula pendula

<400> 9  
Thr Lys Asp Ser Ala Ala Glu Lys Ala Arg Glu  
1 5 10

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/DE 03/02245

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
IPC 7 C07K14/00 C07K17/00 G01N33/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 7 C07K G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, SEQUENCE SEARCH, PAJ, BIOSIS, WPI Data

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WOLKERS WF ET AL.: "Isolation and characterization of a D-7 LEA protein from pollen that stabilizes glasses in vitro" BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA, vol. 1544, 2001, pages 196-206, XP002265093	1-8, 11-14
Y	the whole document	9,10
X	SALES K ET AL.: "The LEA-like protein HSP 12 in Saccharomyces cerevisiae has a plasma membrane location and protects membranes against desiccation and ethanol-induced stress" BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA, vol. 1463, 2000, pages 267-278, XP002265094	1-8,11, 12
Y	page 272 -page 274 --- -/--	9,10

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents:

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

\*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

\*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

\*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

\*Z\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

15 December 2003

Date of mailing of the international search report

13/01/2004

Name and mailing address of the ISA  
European Patent Office, P.O. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Schmidt, Harald

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/DE 03/02245

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	BROWNE J ET AL.: "Plant desiccation gene found in a nematode" NATURE, vol. 416, 7 March 2002 (2002-03-07), page 38 XP002265095 cited in the application	1-8
Y	the whole document	9,10
Y	US 5 624 831 A (VU KHUE NGUYEN ET AL) 29 April 1997 (1997-04-29) claims 1-4; examples 1-3	9,10

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/DE 03/02245

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5624831	A	29-04-1997	BE EP	1008221 A3 0675197 A1
				20-02-1996 04-10-1995